

## Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas

Lorena Natácia da Silva Lopes<sup>1</sup>, Aline Suelen Silva<sup>1</sup>, Caio César de Oliveira Pereira<sup>1</sup>, Irandilson Pessoa Pinto de Menezes<sup>1</sup>, Guilherme Malafaia<sup>1</sup>, Milton Luiz da Paz Lima<sup>1</sup>

### RESUMO

Objetivo com este trabalho foi determinar a sensibilidade de isolados de *C. gloeosporioides* a fungicidas *in vitro*. Oito isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes a coleção foram testados *in vitro* e sua sensibilidade testada para os seguintes fungicidas: i) tiofanato metílico, ii) trifloxistrobina + tebuconazol, iii) piraclostrobina + epoxiconazol, vi) azoxistrobina + ciproconazol, nas concentrações de 0.1, 1, 10, 100 ppm (além do controle). O experimento inteiramente casualizado, em fatorial representado por : fator isolado, fator dosagem e fator tipo de fungicidas, com duas repetições. O isolado de *Colletotrichum* oriundo de soja foi o que teve estatisticamente o maior diâmetro de colônia em relação aos demais isolados analisados. A mistura de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol foi a que estatisticamente apresentou maior porcentagem de inibição, diferindo estatisticamente dos demais fungicidas analisados. A maioria dos isolados adequaram-se na classe dos isolados intermediários, sendo detectado dentre os oito isolados nenhuma população ou isolado com comportamento de insensibilidade ou resistência aos fungicidas utilizados para controle, já que a 100 ppm não houve crescimento micelial de nenhum isolado. As maiores amplitudes de EC<sub>50</sub> foram observadas para os fungicidas Trifloxistrobina+tebuconazol e Piraclostrobina+epoxiconazol, demonstrando que entre os isolados testados para esses dois fungicidas existe maior diversidade da sensibilidade a essas moléculas. Através desse trabalho podemos verificar a variabilidade de sensibilidade que isolados *Colletotrichum gloeosporioides* podem apresentar perante as diferentes moléculas utilizadas comercialmente para seu controle

**Palavras-chave:** sensibilidade a fungicida, *Colletotrichum* ssp., resistência, antracnose

### Sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates by fungicide

### ABSTRACT

Selection pressure promoted by fungicides in agriculture stimulates pathogen variability mechanisms to develop populations insensitive to chemical molecules. Aim of this work was to determine the susceptibility of isolates of *C. gloeosporioides in vitro* fungicide. Eight isolates of *C. gloeosporioides* belonging to collection were tested *in vitro* and tested for sensitivity to the following fungicides: i) methyl thiophanate, ii) trifloxystrobin + tebuconazole, iii) pyraclostrobin + epoxiconazole, vi) azoxystrobin + cyproconazole, at concentrations of 0.1, 1, 10, 100 ppm (and zero fungicide). The complete randomized, factorial represented by: single factor, dosage and factor type of fungicides, with two replications. The isolate of *Colletotrichum* come from soy is what statistically the largest diameter of colony had compared to other isolates analyzed. Fungicide mixture trifloxystrobin + tebuconazole was that statistically had a higher percentage of inhibition, differing from the other analyzed fungicides. Most isolates are suited in the class of isolated intermediates being detected among the eight strains isolated in any population or behavior insensitivity or resistance to the fungicides used for controlling, since the 100 ppm there was no mycelial growth of any isolated. The highest amplitudes were observed EC50 for Pyraclostrobin and Trifloxystrobin + tebuconazole + epoxiconazole fungicides, showing that among the isolates tested for these two fungicides there is a greater diversity of sensitivity to these molecules. Through this work we can see the sensitivity of variability that isolated *Colletotrichum gloeosporioides* may appear before the different molecules used commercially for its control.

**Keywords:** fungicide sensitivity, *Colletotrichum* ssp., resistance, anthracnosis

**Autor para correspondência:** Milton Luiz da Paz Lima  
Rodovia Geraldo Silva Nascimento, km 2,5, s/n, Zona Rural, Urutaí, GO, Brasil.

E-mail: fitolima@gmail.com

**Recebido em:** 03 mar. 2015

**Aceito em:** 25 mar. 2015

<sup>1</sup>Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí, GO, Brasil

## INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* sp. Corda (1831) trata de um fungo fitopatogênico altamente destrutivo e frequente no mundo. Envolve espécies que causam doenças de expressão econômica em leguminosas, cereais, hortaliças e culturas perenes, incluindo diversas frutíferas (Serra et al., 2008; Bergamin Filho et al., 1995).

O gênero *Colletotrichum* possui 769 espécies válidas em literatura, representadas por espécies, *formae speciales* e variedades dentre estas merecem destaque *C. lagenaria* (chuchu, abóboras, pepino); *C. manihot* (mandioca), *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., 1884, (manga, banana, mamão, laranja, entre muitos outros); *C. acutatum* J.H. Simmonds, 1968 (morango e outros); *C. musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, 1957 (banana); *C. capsici* (Syd. & P. Syd.) E.J. Butler & Bisby, 1931 (pimentão, pimenta e condições de saprofitismo); *C. coffeanum* F. Noack, 1901 (café); *C. glycines* Gonz. Frag., 1923 (soja); *C. dracaenae* Petch, 1925 (dracena); *C. kaki* Maffei, 1921 (caqui), *C. lycopersici* Chester, 1891 (tomate); *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, 1889 (feijão) (Index Fungorum, 2013).

A espécie *C. gloeosporioides* merece destaque por apresentar maior número de variantes representadas por 12 *formae speciales* e 08 variedades pertencentes a espécie. *Colletotrichum acaciae*, *C. caudatum*, *C. corni*, *C. dicheae*, *C. curvatum* (Index Fungorum, 2013), e outras variedades e *formae speciales* de fungo pertencente ao gênero *Colletotrichum* sp. Esse fungo possui como fase teleomórfica ascomiceto pertencente ao gênero *Glomerella* sp. A posição taxonômica de *Colletotrichum* sp. é: Reino Fungi, grupo dos Fungos Mitospóricos e sub-grupo dos Coelomicetos (Kirk et al., 2001).

No Brasil foram registrados 59 fungos *Colletotrichum* sp., dentre eles consta-se por exemplo o *Colletotrichum andropogonis*, que foi encontrado infectando sorgo na região de São Paulo e Rio de Janeiro; tal como, *Colletotrichum manihotis*, o qual foi registrado infectando mandioca na região de SP e RJ. O gênero *Colletotrichum* sp. foi registrado em 154 hospedeiras, dentre eles, no pimentão, cravo da Índia, mamão, café, pepino, eucalipto, algodão, jabuticaba, jiló, batata, na maioria destas o fungo ocorreu em sementes, causando doenças como antracnose, mancha foliar, sarna e podridão dos frutos (Embrapa, 2013).

A antracnose é a denominação etiológica da doença que ocorre de forma generalizada nas lavouras de todos os Estados produtores do Brasil principalmente quando predomina condições de elevada umidade, temperaturas moderadas e

chuvas prolongadas. Essa doença, além de provocar redução no rendimento da cultura, também pode afetar a qualidade. Em condições favoráveis que propiciam o desenvolvimento da doença em campo notam-se plantas amareladas no meio do estande o que é referido como sintoma de "mosqueado" (KIMATI et al., 2005). Nas condições de Cerrado a maior incidência da doença ocorre em épocas chuvosas tanto em plantas nativas como plantas exóticas.

Neto e Fancelli (2000) apontaram que o agente causal da antracnose pode permanecer no solo por até 24 meses nos resíduos culturais. As estratégias que podem ser utilizadas para o controle da antracnose incluem as práticas culturais, a resistência genética do hospedeiro (para interações com especificidade ao hospedeiro) e o emprego de fungicidas.

A utilização de cultivares resistentes é para o produtor, a forma mais prática e econômica de controle. Porém, devido a variabilidade apresentada pelo patógeno e em alguns casos o fato do organismo ser polífago dificulta a obtenção de cultivares resistentes pelos programas de melhoramento, como consequência, os produtores acabam utilizando cultivares suscetíveis ou não tolerantes. Nesse caso, é necessária a utilização do controle químico (Rava, 2002). Nos patossistemas onde não se encontra genótipos resistentes, recomenda-se a busca por materiais que apresentem tolerância a doença (que com a doença produzam e não sejam afetados pela severidade da doença).

A utilização do controle químico é uma forma eficiente de controle para diversos problemas fitossanitários dentre eles a antracnose. Os fungicidas apresentam resultados rápidos, facilidade na aplicação, por isso sua utilização esta cada vez mais difundida. Entretanto vem enfrentando sérios problemas com o surgimento de estirpes de fungos fitopatogênicos sensíveis na população (Ghini e Kimati, 2000).

A antracnose por se tratar de uma doença transmitida por semente e resíduos culturais que pode atingir rápido progresso é facilmente introduzida e disseminada. Sob fatores ambientais favoráveis a doença o uso de fungicidas torna-se a única alternativa viável. Entretanto a pressão de seleção promovida por moléculas de fungicidas frequentes na lavoura geram grandes problemas como a sensibilidade a fungicida (Ghini e Kimati, 2000).

Alguns fungos quando ameaçados ativam mecanismos de variabilidade ligada a mutação ou reprodução sexual, por exemplo, para expressão de genes que ativem a insensibilidade ou resistência a fungicidas. A capacidade de se multiplicar e a

diversidade que os fungos possuem favorecem a seleção de linhagens e populações resistentes surgidas aleatoriamente ou induzidas (Tozze et al., 2004).

Pesquisadores tem se referido ao fenômeno da resistência como uma perda de sensibilidade dos fungos aos produtos, resultando em uma diminuição da eficiência destes sob condições de campo (Ghini e Kimati, 2000). Pode-se dizer que o fenômeno da resistência teve início com o surgimento dos fungicidas sistêmicos, devido seu mecanismo de ação ser definido como “sítio – específico”, o fungicida agindo em apenas determinadas rotas metabólicas dos fungos (Rodrigues et al., 2007).

A medida que a população humana aumenta, cresce paralelamente a demanda por alimentos. Para atender a necessidade crescente de alimentos, é importante o aumento não apenas da área cultivada, mas principalmente da produtividade. Torna-se necessário a busca de tecnologias que visam combater alguns fatores que são limitantes a produção agrícola, como a incidência de doenças, pragas e plantas daninhas (Reis et al., 2007).

O objetivo deste trabalho é avaliar sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* fungicidas utilizados para controle de antracnoses.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleção micológica

Os isolados de *Colletotrichum* sp. utilizados foram obtidos a partir da Coleção Micológica de Referência do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia do Instituto Federal Goiano câmpus Urutaí, preservados em sílica gel. A sensibilidade aos fungicidas utilizados foi avaliada nos isolados oriundos de diferentes plantas hospedeiras, representadas por: caqui (código 16), soja (código 17), iuca (código 21), mandioca (código 22), antúrio (código 23), dracena (código 24), uva (código 25) e tomate (código 28). Previamente, os isolados foram identificados como sendo pertencentes a espécie *C. gloeosporioides*. É importante ressaltar que todos os isolados depositados na coleção, foram oriundos de culturas monospóricas, que consistem na preservação de uma colônia do isolado oriunda de apenas uma única unidade vegetativa de crescimento - o conídio.

Selecionaram-se os isolados da coleção conservados sob forma de Sílica Gel, despejou-se uma pequena quantidade na superfície do meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA – Scharlau Microbiology®). As placas após devidamente identificadas e vedadas, foram incubadas em câmara de crescimento (Tecnal TE - 401®) à

temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, após 48 horas, observou-se a produção de micélio, em seguida encaminhou-se as placas para câmara de fluxo laminar para repicagem por discos de micélio em uma nova placa BDA, resultando a formação de placas “matrizes”, que incubaram pelo período de 7 a 10 dias.

### Soluções estoque dos fungicidas

A partir de uma solução estoque de 100 ppm do ingrediente ativo (i.a.) procedeu-se a diluição, de 25 mL + H<sub>2</sub>O destilada até completa 250 mL produzindo assim a concentração desejada de 10 ppm. Diluição de 2,5 mL da solução estoque mais H<sub>2</sub>O destilada até completar 250 mL produzindo a concentração de 1 ppm. Outra diluição realizada foi de 0,25 mL da solução estoque mais H<sub>2</sub>O destilada até completar 250 mL produzindo a concentração de 0,1 ppm.

### Difusão de fungicida no meio de cultura

Após adicionar 25 mL da solução estoque das soluções estoques das concentrações de 0,1 ppm; 1 ppm; 10 ppm; 100 ppm no meio de cultura, a temperatura de 38 a 40 °C, em câmara de fluxo realizou-se homogeneização do meio de cultura, procurando não formar espuma. Então os meios contendo os quatro tipos de fungicidas foram vertidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

Os fungicidas utilizados foram Tiofanato metílico (grupo químico Benzimidazol - Cerbion 500®), Trifloxistrobina + Tebuconazol (grupos químico Estrobirulina + Triazol -Nativo®), Piraclostrobina + Epoxiconazol (grupo químico Estrobirulina+Estrobirulina - Opera®), Azoxistrobina + Ciproconazol (grupo químico Azostrobina + triazol - Prori Xtra®), mais a testemunha em que não foi difundido fungicida no meio de cultura. Os tipos de fungicidas utilizados no experimento foram classificados de acordo com a sua mobilidade como sistêmicos.

### Procedimento de inoculação nas placas contendo os fungicidas

Após solidificação do meio contendo fungicida, houve a retirada dos discos de micélio 10 mm de diâmetro da cultura matriz (7-10 dias de idade) descrita anteriormente contendo micélio dos isolados de *C. gloeosporioides*, com o auxílio de um cortador de micélio e colocados no centro das placas de Petri apresentando as diluições de fungicidas.

### Delineamento estatístico: fatores, variáveis e tratamentos

O teste foi realizado em lotes de isolados, com delineamento inteiramente casualizado em

fatorial, com duas repetições. Os fatores e variáveis independentes foram isolados (oito tratamentos), dosagens (cinco tratamentos), tipos de fungicidas (quatro tratamentos), interação dosagem x fungicida (20 tratamentos), interação isolados x dosagem (40 tratamentos), interação isolados x fungicida (20 tratamentos) e interação isolado x fungicida x dosagem (160 tratamentos). As variáveis dependentes utilizadas foram o diâmetro da colônia, e os parâmetros calculados a partir desta foram a porcentagem de crescimento (PC), porcentagem de inibição do crescimento (PI) e a eficiência de controle a 50 % do crescimento micelial (EC<sub>50</sub>).

#### Procedimento de avaliação de cálculo de parâmetros: diâmetro da colônia, porcentagem de crescimento, porcentagem de inibição eficiência de controle (EC<sub>50</sub>)

Aos sete dias de incubação, foi mensurado o diâmetro da colônia (mm nas duas direções) sendo subtraído 11 mm referentes ao diâmetro do disco do inóculo. Então a partir destes dados, calculou-se a porcentagem de inibição (PI) e crescimento (PC), que são parâmetros de proporções inversas. Assim a PI e a PC foi calculada da seguinte forma: os valores dos diâmetros de colônia sem fungicida (controle) representam o crescimento a 100%, então por regra de três, para cada isolado foi calculado a porcentagem de crescimento (sempre menor em relação a testemunha) para suas repetições e suas diluições de 0,1, 1, 10, 100 ppm dos fungicidas utilizados no experimento.

Foi também estimada a concentração efetiva do fungicida capaz de inibir em 50 % do crescimento micelial (EC<sub>50</sub>). O EC<sub>50</sub> foi calculado com base na porcentagem de crescimento de cada isolado nas diferentes concentrações dos fungicidas quando comparados ao crescimento nas placas sem fungicidas (testemunha), após regressão das porcentagens (X) versus o log<sub>10</sub> da concentração de fungicidas (Y). Foi utilizado o procedimento PROJ.LIN (X;Y) do pacote Office do Windows - Excel 2007.

Com base nos valores de EC<sub>50</sub> e nas porcentagens de crescimento obtidos das concentrações de 10 a 100 ppm de fungicida, os isolados foi classificados em três níveis de sensibilidade o critério 1) sensíveis – 0 a 20 %, 2) intermediários – 21 a 80 % e 3) resistentes – 81 a 100 % do controle.

Análise de dados: foram calculadas as porcentagens de crescimento para todas as dosagens e todos os isolados em uma avaliação aos sete dias.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise da variância dos dados de crescimento micelial e da porcentagem de inibição dos isolados de *Colletotrichum* sp., indicam que existe diferença significativa entre os tratamentos de cada fator, assim como interação entre os fatores de variação: Isolados, Dosagem, Fungicidas, Dosagem x Fungicidas, Isolados x dosagem, Isolado x Fungicida x dosagem (Tabela 1). Os baixos valores de coeficiente de variação demonstram que os dados observados satisfazem a premissa de normalidade.

**Tabela 1.** Listagem de fatores de variação e valores F e sua significância analisados utilizando procedimento ANOVA.

Fatores de variação	Diâmetro da colônia (mm)	% de inibição
Isolados	F <sub>7, 160</sub> = 58,18**	F <sub>7, 128</sub> = 36,82**
Dosagem	F <sub>4, 160</sub> = 3580,22**	F <sub>3, 128</sub> = 2550,82**
Fungicida	F <sub>3, 160</sub> = 164,15**	F <sub>3, 128</sub> = 76,57**
Dosagem x Fungicida	F <sub>12, 160</sub> = 33,91**	F <sub>9, 128</sub> = 10,72**
Isolados x Dosagem	F <sub>28, 160</sub> = 14,89**	F <sub>21, 128</sub> = 12,25**
Isolados x Fungicida	F <sub>21, 160</sub> = 33,59**	F <sub>21, 128</sub> = 30,41**
Isolado x Fungicida x Dosagem	F <sub>84, 160</sub> = 12,74**	F <sub>63, 128</sub> = 12,34**
Coeficiente de variação	6,3	10,4

\* rejeita-se a hipótese de nulidade a P~0,01, \*\* rejeita-se a hipótese de nulidade a P~0,05

O isolado de *C. gloeosporioides*, oriundo de soja apresentou os maiores diâmetro de crescimento micelial, diferindo estatisticamente dos demais, nas diferentes concentrações e tipos de

fungicidas. Os isolados derivados de iuca e caqui apresentaram as menores médias do crescimento micelial, diferindo dos demais expressivamente (Figura 1A). As culturas vegetais em que se tem

registrado maiores números de moléculas comerciais de fungicidas, são aquelas que apresentam maior expressão econômica. Consequentemente, estas apresentam maior frequência da agricultura, resultando numa maior pressão de seleção que induz a seleção de populações de *Colletotrichum* geneticamente insensíveis aos produtos tradicionalmente aplicados para seu controle, como ocorreu com o isolado de soja.

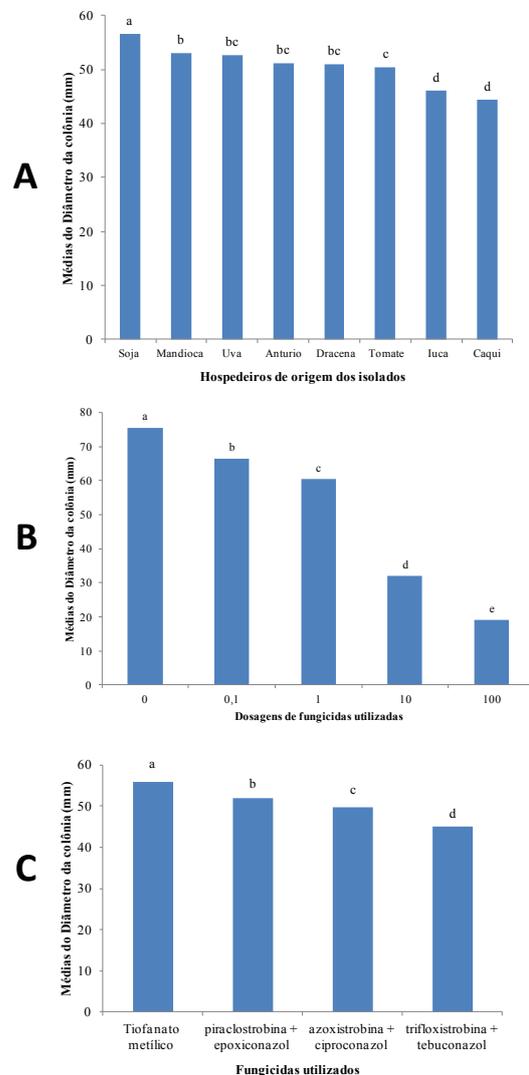
Como era esperado as dosagens maiores de fungicidas promoveram menores crescimentos miceliais, diferindo estatisticamente da testemunha que apresentou o maior crescimento micelial em relação as diferentes dosagens (Figura 1B). Os diferentes tipos de fungicidas utilizados todos diferem entre si, ao teste Tukey ( $P \sim 0,05$ ). O fungicida que apresentou o maior inibição micelial *in vitro* foi o princípio ativo Trifloxistrobina + Tebuconazol, sendo que o fungicida Tiofanato metílico foi aquele que os isolados apresentaram maiores diâmetros de crescimento e, portanto, menor efeito inibitório ao crescimento (Figura 1C).

Azevedo (2007) demonstrou que o grupo químico dos Bezimidazóis, como o Tiofanato metílico utilizado neste trabalho, apresenta dentre os demais grupos químicos o maior número isolados sensíveis a este fungicida. Este efeito se deve a seu mecanismo de ação sítio – específico, agindo no gene  $\beta$  – tubulina que tem papel importante na divisão celular, e sua mutação impede a ligação com o fungicida (Yan et al.1996). Comparativamente *in vitro* a mistura teve menor inibição que o ingrediente ativo puro.

Nas comparações entre médias da porcentagem de inibição do crescimento micelial nos diferentes isolados de *Colletotrichum* sp., os isolados de caqui, iuca e antúrio foram mais sensíveis aos fungicidas aplicados e diferiram estatisticamente dos demais analisados (Figura 2A). Este comportamento fenotípico mais sensível deve-se a menor pressão de seleção de populações dos isolados de *Colletotrichum* sp. resistentes aos grupos químicos aplicados, dado a menor quantidade de moléculas registradas e de uso para controle de antracnoses nas as culturas caqui, iuca e antúrio, que são plantas de menor expressão econômica.

Ao contrário, dos isolados da soja, que tiveram destaque neste trabalho, devido a cultura apresentar maior número de registros de fungicidas, aumenta a chance nesse patossistema de se encontrar cepas ou isolados que apresente insensibilidade ou resistência a fungicidas. No entanto, o isolado de dracena por exemplo - uma cultura sem registro de moléculas para controle de antracnoses - também estatisticamente apresentou

maior insensibilidade, sendo similar ao isolado de soja. Desta maneira, indica que a sensibilidade a todos os fungicidas aplicados está relacionada ao isolado e não ao hospedeiro de origem (Figura 2A).

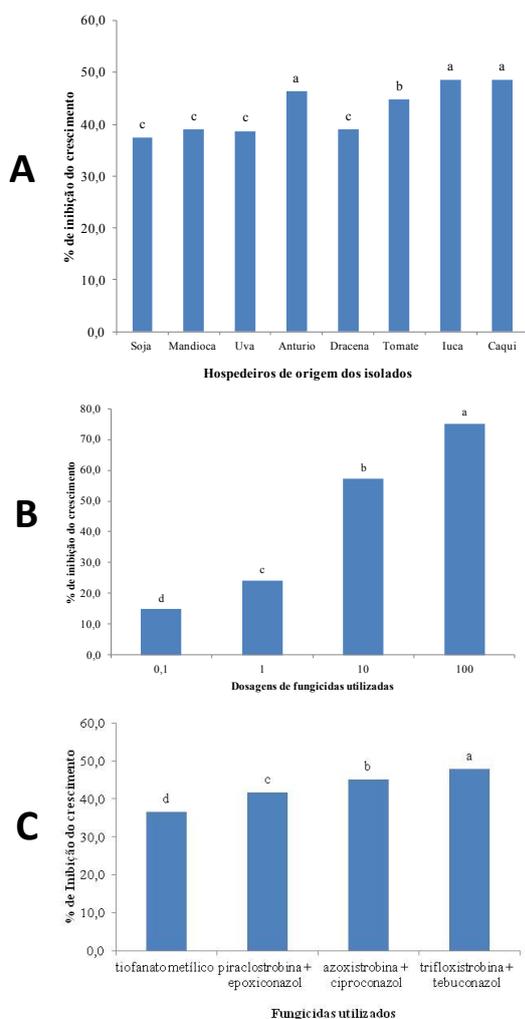


**Figura 1.** Médias do diâmetro da colônia (mm) diferentes isolados *Colletotrichum* spp. A. tipos diferentes de isolados de acordo com seus hospedeiros de origem, B. diferentes dosagens de fungicidas, C. tipos de fungicidas.(valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, ao teste Tukey ( $P \sim 0,05$ )).

Já em relação dosagem de fungicida e os tipos de fungicidas utilizados Tiofanato metílico, Triflostrobina + Tebuconazol, Piraclostrobina + Epoxiconazol, Azostrobina + Ciproconazol todos diferem entre si pelo teste de Tukey a  $P \sim 0,05$ , assim quanto maior foi a dosagem dos fungicidas aplicados maior a porcentagem de inibição do crescimento, para todos os fungicidas testados no experimento (Figura 2B).

Dos diferentes tipos de misturas e i.a. de fungicidas registrados (Agrofit 2013) para controle

de antracoses, nos experimentos *in vitro*, a mistura Trifloxistrobina+Tebuconazol promoveu maior inibição do crescimento micelial diferindo estatisticamente das demais misturas e moléculas utilizadas. Já o i.a. Tiofanato metílico, amplamente utilizado para controle de antracoses, promoveu a menor porcentagem de inibição do crescimento, diferindo significativamente dos demais no experimento realizado (Figura 2C).



**Figura 2.** Médias da porcentagem de inibição do crescimento nos diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. (A), dosagens de fungicida (B) e tipos de fungicidas (C) (médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a  $P \sim 0,05$ )

A eficiência de controle a 50% ( $EC_{50}$ ) do crescimento micelial calculado para cada fungicida testado está demonstrado na tabela 2. A  $EC_{50}$  para o isolado de dracena (14,42) e caqui (30,30) para o fungicida Tiofanato metílico, o isolado de caqui (6,95) e iuca (27,16) para o fungicida Trifloxistrobina + Tebuconazol, o isolado dracena (9,95) e antúrio (27,11) para o fungicida Piraclostrobina + Epoxiconazol, o isolado soja (17,7) e antúrio (25,3) para o fungicida Azoxistrobina + Ciproconazol

representam a amplitude de concentração responsável por inibir o crescimento micelial. As maiores amplitudes de  $EC_{50}$  foram observadas para os fungicidas Trifloxistrobina+Tebuconazol e Piraclostrobina+Epoxiconazol (Tabela 3), demonstrando que entre os isolados testados para esses dois fungicidas existe maior diversidade da sensibilidade a essas moléculas.

A sensibilidade a Tiofanato metílico de acordo com o critério utilizado, foi observada para os isolados de caqui e tomate, em ambas as concentrações. O isolado de iuca foi classificado como sensível a Tiofanato metílico apenas na concentração de 100 ppm. Curiosamente, apenas para o fungicida Tiofanato metílico os isolados foram classificados como insensíveis (resistentes), como foi observado para o isolados de dracena e mandioca na dosagem de 10 ppm (Tabela 2). Para Santos (2006) entre os benzimidazóis, o Tiofanato metílico vem sendo amplamente utilizado em vários estados brasileiros há mais de 15 anos no controle de doenças em varias culturas, favorecendo a seleção de população resistentes. Patógenos resistentes a esse fungicida causa além dos danos nas culturas devido à ineficiência do controle também encarecem o custo de produção, visto que por muitas vezes o produtor tende a aumentar o número de aplicações ou a dose recomendada na esperança de conseguir um melhor controle e com isso contribui para o aumento de populações resistentes.

Ainda na tabela 2 observa-se que todos os isolados nas diluições de 10 e 100 ppm foram classificados como intermediários na mistura Trifloxistrobina + Tebuconazol, assim como na mistura Piraclostrobina + Epoxiconazol, com exceção para segunda mistura que isolados de antúrio, tomate e iuca apresentaram sensibilidade na concentração de 100 ppm do produto químico. A sensibilidade a Azoxistrobina + Ciproconazol foi observada para isolados de caqui a 10 ppm e para os isolados de antúrio, caqui, uva, tomate e iuca na concentração de 100 ppm. Os demais isolados foram classificados como intermediários.

Dos isolados analisados somente 6, 84 e 9 % para a concentração de 10 ppm foram classificados como resistentes, intermediários e sensíveis aos fungicidas, respectivamente. Enquanto para concentração de 100 ppm não se constatou isolados com comportamento fenotípico de resistência, verificando apenas comportamentos intermediário e sensível em 64 e 34 % do isolados estudados (Figura 3).

A maioria dos isolados adequaram-se na classe dos isolados posicionados como classe de susceptibilidade aos fungicidas testados como intermediários. Desta forma, não foi identificado

dentre os oito isolados testados nenhuma cepa com comportamento de insensibilidade ou resistência aos fungicidas recomendados para controle de antracoses (tem como agente causal

*Colletotrichum gloeosporioides*), já que à 100 ppm não houve crescimento micelial de nenhum isolado testado (Figura 3).

**Tabela 2.** Porcentagem de crescimento médio aos 10 ppm e 100 ppm, eficiência de controle (EC<sub>50</sub>) e classes de reação para os fungicidas Tiofanato metílico (Cerbion 500®), Trifloxistrobina+Tebuconazol (Nativo®), Piraclostrobina+Epoxiconazol (Opera®), Azoxistrobina+Ciproconazol (Prori Xtra®), nas concentrações de 10 ppm e 100 ppm para os isolados analisados\*.

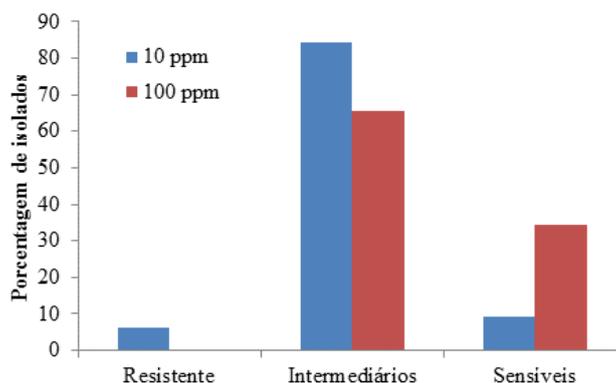
Isolados	% de Crescimento 10 ppm	% de Crescimento 100 ppm	EC <sub>50</sub> (mg ia/mL)	Tiofanato metílico		% de Crescimento 10 ppm	% de Crescimento 100 ppm	EC <sub>50</sub> (mg ia/mL)	Trifloxistrobina +	
				10 ppm	100 ppm				10 ppm	100 ppm
Soja	57	46	20,6964	I	I	39	25	18,4853	I	I
Antúrio	66	22	20,2712	I	I	25	22	26,0251	I	I
Caqui	16	16	30,3024	S	S	58	41	6,9490	I	I
Dracena	83	39	14,4274	IS	I	39	22	18,9914	I	I
Uva	63	36	20,8849	I	I	27	23	25,1047	I	I
Tomate	16	16	20,2222	S	S	47	27	23,4861	I	I
Iuca	46	18	22,6304	I	S	24	24	27,1560	I	I
Mandioca	91	22	21,5873	IS	I	34	22	25,3889	I	I

Isolados	% de Crescimento 10 ppm	% de Crescimento 100 ppm	EC <sub>50</sub> (mg ia/mL)	Piraclostrobina + epoxiconazol		% de Crescimento 10 ppm	% de Crescimento 100 ppm	EC <sub>50</sub> (mg ia/mL)	Azoxistrobina + ciproconazol	
				10 ppm	100 ppm				10 ppm	100 ppm
Soja	64	34	20,7516	I	I	33	33	17,7778	I	I
Antúrio	23	16	27,1111	I	S	22	18	25,3095	I	S
Caqui	21	21	21,8516	I	I	20	20	24,2515	S	S
Dracena	54	44	9,9458	I	I	51	31	19,1845	I	I
Uva	57	35	19,5030	I	I	42	16	23,8485	I	S
Tomate	50	18	22,0528	I	S	73	16	23,2096	I	S
Iuca	30	18	26,6250	I	S	22	16	18,2778	I	S
Mandioca	57	31	18,4744	I	I	27	20	22,4221	I	I

\*EC<sub>50</sub> - quantidade do fungicida capaz de inibir o crescimento micelial a 50% em placas de Petri; Classes de sensibilidade: 0-20% de % de crescimento - sensíveis (S), 21-80% de crescimento Intermediário (I), 81-100% de crescimento resistente (R) ao ingrediente ativo ou mistura.

**Tabela 3.** Amplitudes das EC<sub>50</sub> para os isolados para os diferentes tipos de fungicidas.

Fungicidas	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30
Tiofanato metílico						
Trifloxistrobina+Tebuconazol						
Piraclostrobina+Epoxiconazol						
Azoxistrobina+Ciproconazol						



**Figura 3.** Percentagem dos isolados nas repetições que foram classificados como resistentes, intermediários e sensíveis as moléculas Tiofanato Metílico (Cerbion 500®), Trifloxistrobina+Tebuconazol (Nativo®), Piraclostrobina+Epoxiconazol (Opera®), Azoxistrobina+Ciproconazol (Prori Xtra®), nas concentrações de 10 ppm e 100 ppm.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que: o crescimento dos isolado é inversamente proporcional à dose dos fungicidas utilizados, isto é, quanto maior a dose do fungicida, menor o crescimento micelial do isolado.

A maioria dos isolados adequam-se na classe dos isolados intermediários, sendo detectado dentre os oito isolados nenhuma população ou isolado com comportamento de resistência as moléculas utilizadas para controle. Além disso, nenhum dos fungicidas testados (Tiofanato metílico, Triflostrobina+Tebuconazol, Piraclastrobina+Epoxiconazol, Azostrobrina+Ciproconazol) é eficientes na inibição total da germinação dos conídios dos isolado de *Colletotrichum* sp., em nenhuma das doses testadas.

Através desse trabalho podemos verificar a variabilidade de sensibilidade que isolados *Colletotrichum gloeosporioides* podem apresentar perante as diferentes moléculas utilizadas comercialmente para seu controle.

## REFERÊNCIAS

- Agrofit. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acesso em 10 de Julho de 2013.
- Azevedo LAS. Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional. Campinas: Emopi Gráfica Editora Ltda, 2003. 346 p.
- Azevedo LAS. Fungicidas sistêmicos: teoria e prática. Fundamentos para o uso racional. Campinas: Emopi Gráfica Editora Ltda, 2007. 290 p.
- Bergamim Filho A, Amorim L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: consequências para resistência a fungicidas. Fitopatologia Brasileira, 26 (2): 119 – 127, 2001.
- Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3a Ed, Vol. I, Editora Agronômica Ceres Ltda, São Paulo SP. 1995
- Brent KJ. Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como manejá-la? Brussels-Belgium: GPCF (FRAC Monograph No.1), 1995, 51p.
- Davidse LC. Benzimidazole compounds: selectivity and resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. p. 60-70.
- Davidse LC, Flach W. Differential binding of methyl benzimidazol –2 - yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. The Journal of Cell Biology, 72: 93-174, 1977.
- Damicone J. Fungicide resistance management. Oklahoma: Oklahoma State University, 2004. Disponível

em:

<<http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2317/F-7663web.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2008.

Domingues RJ, Tófoli JG, Oliveira SHF, Garcia Júnior O. Controle químico da flor preta (*Colletotrichum acutatum* Simmons) do morangueiro em condições de campo. Arquivo Instituto Biológico, 68 (2): 37-42, 2001.

Forcelini, C. A. Resistência de fungos a fungicidas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 2: 335-355, 1994.

Fortes JF. *Glomerella cingulata* e *Penicillium* sp.: surgimento de cepas resistentes ao benomyl. Fitopatologia Brasileira, 10: 280, 1985.

Frac – Comitê de Ação a resistência a fungicida. Disponível em: <http://www.frac-brasil.org.br/frac/default.asp>. Acessado em março 2013.

Galli F. Manual de Fitopatologia Princípios e Conceitos. vol.1, p. 353 e 354: 1978.

Ghini R, Kimati H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

Goulart ACP. Fungicidas inibidores do esterol. II. Imidazoles. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 3: 365-390, 1995.

Hall R (Ed). Compendium of bean disease, APS Press, 1994, 73 p.

Index fungorum disponível em:< <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=170999>>, acessado em julho de 2013.

Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin AF. Manual de Fitopatologia - Doenças das plantas cultivadas. 4° ed. São Paulo: Agronômicas Ceres, 2005. pp 542.

Kimati H, Bergamin Filho A. Princípios gerais de controle. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Ed.). Manual de fitopatologia - Princípios e conceitos. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 692-709.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. Dictionary of Fungi Ainsworth & Bisby's. CABI Europe - UK, 2008.

Marionni ACE, Barros M. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. Summa Phytopathologica, 28 (2): 197-200, 2002.

Neto DD, Fancelli AL. Principais doenças fúngicas da parte aérea. In: Neto DD, Nancelli, A. L. Produção de feijão. Livraria e editora agropecuária, 2000, p. 269-275.

Parra G, Ristaino JB. Resistance to mefenoxam ans metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. Plant Disease, 85 (10), p. 1069-1075, 2001.

Rava CA. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum. Summa Phytopathologica, 28 (1): 65-69, 2002.

Rava CA, Sartorato A. Antracnose. In: Sartorato A, Rava CA. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Embrapa: Brasília, 1994, p. 17-40.

Reis ME, Reis AC, Forcelini AC. Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas. 5. ed., rev. e ampl. Universidade de Passo Fundo: Passo Fundo, 2007.

Roberts PD, Pernezny KL, Kucharek TA. University of Florida IFAS Extension. Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. on pepper. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pp104>> Acessado em fevereiro de 2012.

Rodrigues MBC, Andreote FD, Spósito, MB, Vildoso CIA, Araujo WL, Kleiner AAP. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 42 (3), 2007.

Serra IMRS, Coelho RSB, Menezes MM. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multiespóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Agronomia / Fitossanidade. Summa Phytopathologica: Botucatu, 2008.

Silva ACF, Rosa CRA, Melo IS. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. Revista Científica do Centro de Ciências Rurais, 3 (29): 395-399, 1999.

Silva SMMC, Fay FE. Agrotóxicos e Ambiente. EMBRAPA: Brasília, Informação Tecnológica, 2004.

Shattock RC, Shaw DS, Fyfe AM, Dunn JR, Loney KH e Shatock JA. Phenotypes of *Phytophthora infestans* collected in England and Wales from 1985 to 1998, matting type, response to metalaxyl and isoenzyme analysis. Plant Pathology, 39:242-248, 1990.

Sutton BC. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey, England (1980).

Tavares GM, Souza PE. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Ciências e Agrotecnologia, 29 (1): 52-59, 2005.

Tozze Júnior HJ, Mello MBA, Massola Júnior NS. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. Summa Phytopathologica, 30 (1):73-73, 2004.

Venancio WS, Rodrigues MAT, Souza NL, Begliomini E, Peres NA. Efeitos fisiológicos de fungicidas sobre plantas – Parte II. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 13: 49-73, 2005.

Yan K, Dickman MB. Isolation of a  $\beta$ -Tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. Applied and Environmental Microbiology, 22 (8): 3053-3056, 1996.

Zambolim L, Jesus Junior CW. O essencial dos fungicidas empregados no controle de doenças – parte básica. In: Zambolim L, Picanço CM, Silva Ferreira AA; Ferreira AF. Produtos fitossanitários (Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas), Universidade Federal de Lavras, Viçosa, MG, 2008.

Zambolim L; Venâncio SV, Oliveira SHF. Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2007, 168p.